

6. Okabe E. Superoxide anion radical selectively increases  $\text{Ca}^{2+}$  release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel // Nippon Yakurigaku Zasshi. - 1998. - 112, Suppl. 1. - P. 58P - 62P.

## **УЧАСТИЕ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ В МОДИФИКАЦИИ КИСЛОРОДСВЯЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА**

**Зинчук В.В.**

*Государственный медицинский университет, г. Гродно*

В настоящее время активно исследуются различные аспекты биологического действия оксида азота (NO). Его образование происходит из аминокислоты L-аргинина под контролем фермента NO-синтазы в присутствии ряда кофакторов, образующих в совокупности L-аргинин-NO систему. Существует цикл связывания  $\text{O}_2$  и NO в легких и их высвобождения на периферии, который можно рассматривать как систему "трех газов" ( $\text{NO}/\text{O}_2/\text{CO}_2$ ) [Gross S.S., Lane P., 1999]. Представляет интерес изучение взаимодействия гемоглобина с оксидом азота. Взаимодействие NO с гемоглобином в эритроцитах важно для регуляции обоих этих молекул *in vivo*. Существующие свойства эритроцитов не ограничивают взаимодействие гемоглобина с NO в физиологических условиях, не только не разрушая его биоактивность, но и сохраняя ее. Мембрана эритроцитов рассматривается как некий специализированный насос для NO.

В артериальной крови NO в реакции с оксигемоглобином образует нитрат и метгемоглобин, а в венозной - нитрозилгемоглобин ( $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ ), способный при высоких  $\text{pO}_2$  дезинтегрироваться с участием молекулярного кислорода до гемоглобина и  $\text{NO}_3^-$ . Гемоглобин взаимодействует с NO через высокоаффинные  $\text{Fe}^{2+}$ -связывающие участки на геме (его сродство к NO в 8000 раз выше, чем к  $\text{O}_2$ ). Спектр ЭПР  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  в растворе является суперпозицией спектров Т- и R-конформеров гемоглобина с преимущественным образованием Т-формы, которые обусловлены обратимыми переходами от сильного (R) до слабого (Т) взаимодействия  $\text{Fe}^{2+}$ -гем с проксимальным гистидином. Облучение мышей в малых дозах приводит к перераспределению соотношения между Т- и R-конформерами  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  в крови в сторону образования R-формы, что может иметь значение для изменения сродства гемоглобина к кислороду (СГК) [Миль Е.М. и др., 2000]. Образование нитрозилированного гемоглобина, судя по ЭПР-спектру, может быть

одним из механизмов действия нейрорепрессантов на СГК, а именно его снижения (через изменение конформационного равновесия от высокоаффинной формы лигандного тетрамера к низкоаффинной, что характерно и для физиологического модулятора СГК 2,3-дифосфоглицерата) [Ascenzi P. et al., 1999].

Существуют и другие физиологические механизмы связывания циркулирующего в крови NO. Недавно было установлен участок на глобиновой цепи гемоглобина, в котором NO связывается в форме S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb), масс-спектрометрические и кристаллографические данные однозначно идентифицировали  $\beta^{93}$ -цистеин как место связывания NO с гемоглобином [McMahon T.J. et al., 2000].

Перенос NO от S-нитрозотиола на гемоглобин регулируется аллостерически и функционально связан с присоединением  $O_2$ . По мере связывания гемоглобина с  $O_2$  в лёгких его сродство для S-нитрозотиола растёт, а при отдаче снижается, и NO высвобождается в ткани. Существует  $O_2$ -зависимое равновесие между SNO-Hb и  $HbFe^{2+}NO$  (при отсутствии низкомолекулярных тиолов вроде цистеина, мишенью NO является гем с  $Fe^{2+}$ , а в его присутствии следует перенос NO-группы на цистеиновый остаток  $\beta$ -глобина) [McMahon T.J. et al., 2000]. Положение редокс-равновесия между SNO-Hb и  $HbFe^{2+}NO$  связано с аллостерическим состоянием гемоглобина. После дезоксигенации большая доля SNO-HbO<sub>2</sub> превращается в  $HbFe^{2+}NO$ .

Артериовенозное распределение  $HbFe^{2+}NO$  обратно пропорционально SNO-Hb, т.е. большие концентрации нитрозильного гемоглобина обнаруживаются в деоксигенированной крови, и наоборот [Kang E.S. et al., 2001]. SNO-Hb( $O_2$ ) действует как аллостерически контролируемый буфер NO, обменивающий свою NO-группу с тиолами среды, в т.ч. с глутатионом, и тем самым снижая кровоток (выполняя роль критического фактора, определяющего доставку  $O_2$ ). Уровни SNO-Hb в артериальной крови близки к 1 мкмоль. Эритроциты несут примерно в 1000 раз больше SNO-групп, чем это требуется для регуляции кровотока или дилатации кровеносных сосудов [Carter T.D. et al., 1997]. Если бы эти группы превращались при артериовенозном прохождении в биоактивные эквиваленты, то возникала бы гипотензия. Регуляция кровотока требует лишь низконаномольных количеств RSNO, что создавало бы в организме непереносимую метаболическую нагрузку. В сигналах при артериовенозном прохождении для регуляции кровотока участвует лишь малая часть (0,1-1%) связанных с гемоглобином SNO-групп [Jia L. et al., 1996]). По мнению McMahon T.J. et al. [2000] гемоглобин регулирует вытеснение NO-групп, а так как кровоток регулируется наномольными уровнями RSNO, его образование намного важнее для расширения кровеносных сосудов, чем связанное с ним изменение оксигенации крови, которое может происходить лишь при уровнях NO выше

физиологических. На наш взгляд, значения NO-соединений с гемоглобином необходимо также оценивать и через их эффект на СГК.

Различные формы соединений гемоглобина с NO могут по-разному влиять на СГК. NO может изменять СГК по следующим механизмам: переход гемоглобина из конформационного состояния R в T; повышение уровня эритроцитарного метгемоглобина; образование нитрозотиолов и дополнительных продуктов окисления гемоглобина. Метгемоглобин и SNO-Hb повышают СГК, а  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  его снижают, соответственно, первые смещают кривую диссоциации оксигемоглобина влево, а последний – вправо. Высокие дозы нитроглицерина (донора NO) вызывают образование  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ , увеличение концентрации которого коррелирует с увеличением значения  $p_{50}$  и соответствующим сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо [Kosaka H., Seiyama A., 1996]. В наших опытах у животных, получивших L-аргинин и подвергавшихся гипотермии, отмечается наименьший сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево [Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., 2002]. При вдыхании воздуха, содержащего 80 промилей NO, уровень  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  возрастал в 10 раз до микромолярной области, а SNO-Hb существенно не изменялся и не имел значимых артериовенозных градиентов [Cannon R.J. et al., 2001]. Концентрация SNO-Hb и  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  в крови такова, что влияние на кислородсвязывающие свойства крови проявляется при концентрациях NO выше физиологических (или при низком pH, добавлении инозитгексафосфата, низкой температуре) [Jia L. et al., 1996]. Их влияние на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови проявляется при высоких (5 и более %), но в тоже время их эффект может иметь важное значение для процессов газообмена на уровне капилляра [Зинчук В.В., Борисюк М.В., 1999; Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., 2002]. Следует учитывать гетерогенность эндотелия по NO-образующей функции по ходу сосудистого русла. Так, базальный уровень синтеза NO в артериях выше, чем в венах. Содержание NO в артериальной крови у здоровых женщин, судя по показаниям  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , гораздо выше, чем в венозной ( $45,1 \pm 17,7$  в сравнении с  $22, 5 \pm 8,5$  мкмоль) [Ciccinelli E. et al., 1999]. В исследовании на добровольцах показано, что содержание  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  в артериальной крови постоянно выше, чем в венозной [Cannon R.J. et al., 2001]. Учитывая различные доли терминальных артериол, капилляров, венул и вен в общую площадь сосудистой системы и объемы, содержащейся в них крови, можно предположить более высокое содержание NO и его производных на микроциркуляторном участке сосудистого русла (50 и более раз) и соответственно его большую долю, взаимодействующую непосредственно с гемоглобином. На уровне микроциркуляции это может быть чрезвычайно важным для модифицирования его кислородсвязывающих свойств и, в конечном итоге, для оксигенации тканей. Важность связывания NO

с гемами или тиолами гемоглобина состоит не только в эффекте непосредственно на функциональное поведение молекул, переносящих NO (т.е. S-нитрозилирование может служить для запасаания NO через благоприятствование R-структуре, тогда как переход на гем ограничивает его потерю NO при дезоксигенации), но и на популяцию гемоглобина в целом. Очевидно, наблюдаемые изменения СГК наиболее благоприятны для адекватной оксигенации тканей. Внутриэритроцитарная система регуляции СГК, обладающая относительной автономией, обеспечивает адаптивные изменения кислородсвязывающих свойств крови, в этой системе функцию триггера аллостерической регуляции гликолиза и своеобразного аппарата сравнения соответствия метаболизма функциональному статусу выполняет 2,3-дифосфоглицерат, но как показывают наши данные также может быть задействован и NO [Zinchuk V., Borisiuk V., 1998; Zinchuk V., 1999]. В тоже время механизмы транспорта  $O_2$ , и частности, кислородсвязывающие свойства крови, могут влиять на активность L-аргинин-NO системы. Введение предшественника NO - L-аргинина может вызывать положительный эффект на более поздних стадиях гипотермии и сопровождаться менее выраженными нарушениями транспорта кислорода кровью, что, возможно, обусловлено его эффектом на гемоглобин и кровоток [Зинчук В.В., 2001].

Эволюция наших представлений о взаимодействии NO с гемоглобином прошла сложный путь: от понимания роли гемоглобина только как фактора элиминации NO, до его значения как депо, и далее как модификатора кислородсвязывающих свойств гемоглобина. Результаты выполненных нами исследований свидетельствуют о том, что L-аргинин-NO система может участвовать в формировании кислородтранспортной функции крови при окислительном стрессе и гипоксии. Очевидно, эффект коррекции L-аргинин-NO системы обусловлен как результатом прямого действия NO на гемоглобин, так и опосредовано через кислородзависимый механизм регуляции образования NO.

Данная работа выполнена частично благодаря поддержке Фонда фундаментальных исследований РБ (№ Б99-055).

#### *Литература*

1. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма // Успехи физиологических наук. - 1999. - Т.30, №3. - С.38-48.
2. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты // Успехи физиологических наук. - 2001. - Т.30, №3. - С.68-78.
3. Миль Е.М., Каспаров В.В., Бинюков В.И., Табатчикова Н.В., Борисова О.А. Изменение спектров ЭПР нитрозильных комплексов ге-

мопротеинов крови при низкоинтенсивном тотальном облучении мышей // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2000. – Т. 40, № 3. – С. 305-309.

4. Ascenzi P., Bertollini A., Coletta M., Lucacchini A. Stabilization of the T-state of ferrous human adult haemoglobin by chlorpromazine and trifluoperazine // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1999. – Vol. 30, №2. – p.185-187.
5. Cannon R.O., Schechter A.N., Panza J.A., Ognibene F.P., Pease-Fye M.E., Wacławski M.A., Shelhamer J.H., Gladwin M.T. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108, №2. – p. 279-287.
6. Carter T.D., Bettache N., Ogden D. Potency and kinetics of nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation determined with flash photolysis of ruthenium nitrosyl chlorides // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 122. – p.971-973.
7. Cicinelli E., Ignarro L.J., Schonauer L.M., Matteo M.G., Galantino P., Falco N. Different plasma levels of nitric oxide in arterial and venous blood // *Clin. Physiol.* - 1999. - Vol. 19, №5. - p. 440-442
8. Gross S.S., Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96, № 18. - p. 9967-9969.
9. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control // *Nature.* – 1996. – Vol. 380. – p. 221-226.
10. Kang E.S., Ford K., Grokulsky G., Wang Yu-Bo., Chiang T.M., Acchiardo S.R. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins // *J. Lab. Clin. Med.* – 2000. – Vol. 135, № 6. – p. 444-451.
11. Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1996. - Vol.218, №3. - p.749-752.
12. McMahon T.J., Stone A.E., Bonaventura J., Singel D.J., Stamler J.S. Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S-nitrosohemoglobin // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, №22. – p. 16738-16745.
13. Zinchuk V., Borisiuk V. The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats // *Respiration Physiology.* - 1998. - Vol.,113,№1. - p.39-45.
14. Zinchuk V. Effect of NO-synthase inhibition on hemoglobin-oxygen affinity and lipid peroxidation in rabbits during fever // *Respiration.* - 1999. - Vol.,66,№5. - p.448-454.
15. Zinchuk V.V., Dorochina L.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway // *Nitric. Oxide.* – 2002. – Vol. 6, №1.